

特集1：分子機能情報を活用した医学生理学研究の展開

³¹P-NMR スペクトロスコピーによる分子情報の活用早野 尚志^{*,**}, 吉崎 和男^{*}^{*}徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学, ^{**}大津市民病院

(平成20年11月25日受付)

(平成20年11月28日受理)

はじめに

「核磁気共鳴 (NMR) とは50年来用いられてきた化学的分析技術で, われわれが現在 MRI と呼んでいる撮像技術の基礎となっている。核 (nuclear) という言葉は, 核物質を使用しているという誤った意味合いをもっているため, MR に関する言葉から核は外された。そして, 核磁気共鳴断層像 (NMR tomography) は MRI という言葉に置き換えられたのである。」

これは10年前の MRI 解説書の文章である¹⁾。NMR は臨床医学でよく知られた MRI と同じ現象を扱っている。NMR とは, ある種の原子核 N を強力な静磁場 B₀ に置くと, その原子核の種類と静磁場の強度に応じた特定の周波数の電磁波 (ラジオ波) のエネルギーを吸収・放出する現象のことである。1945年 Bloch と Purcell によってこの NMR 現象が発見され, 1973年 Lauterbur によって提案された画像化法によって MRI の出現となった。

MRI は水素原子の核スピンを対象としているが, それ以外にも NMR 現象を示す原子核があり, 生物学的に興味のある核種を表1に示す。本稿では³¹P-NMR の活用について説明する。5 テスラ (T) の磁場では水素原子核で213MHz, リン原子核では86.2MHz の電磁波を吸収・放出する。なお, 磁場強度は慣用的に水素の原子核であるプロトン (陽子) の共鳴周波数で表現されることがある。

ところで, 原子を静磁場 B₀ の中に置くと, 原子核にかかる磁場 B は原子核のまわりの電子によって生じる局所磁場 σB₀ によって減弱され, 実際に原子核にかかる磁場は B₀ (1-σ) となる (図1)。σ は遮蔽定数と呼ばれ, 同じ核種のリン原子でも分子内の配置によって遮蔽の程度は異なることとなる。その違いを活用した分析法が³¹P-NMR スペクトロスコピーである。

表1 医学・生理学的に興味のある核の NMR 特性

核	スピン量子数	5 T での共鳴周波数 (MHz)	天然存在比 (%)
¹ H	1/2	213.0	99.98
² D	1	32.7	0.0156
¹³ C	1/2	53.5	1.1
¹⁴ N	1	15.4	99.6
¹⁵ N	1/2	21.6	0.36
¹⁹ F	1/2	200.0	100.0
²³ Na	3/2	56.3	100.0
³¹ P	1/2	86.2	100.0
³⁵ Cl	3/2	20.9	75.4
³⁹ K	3/2	9.9	9.1

(文献2より改変)。

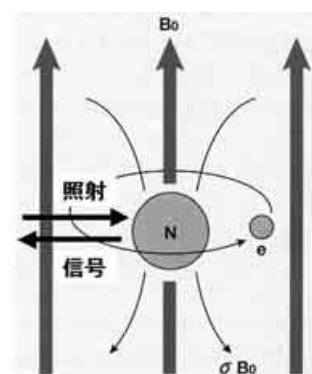


図1 NMR スペクトロスコピーの原理図 (本文参照, 文献3より改変)。

³¹P-NMR スペクトロスコピー

筋肉の³¹P-NMR スペクトロスコピーでは, その組織に含まれるクレアチンリン酸, 無機リン酸, および ATP を構成する3つのリン原子などが測定対象となる。これらのリン原子は, 分子内の配置によってそれぞれのリン

原子核にかかる磁場が異なるため、それぞれのリン原子が吸収・放出する電波の周波数が 10^6 程度異なる。その周波数の差が化学シフトと呼ばれ、Hzの単位あるいは静磁場強度に依存しない σ の単位としてppmで表示される。この化学シフトによって、生きた筋細胞内のATP、クレアチンリン酸、無機リン酸が区別され、それぞれの信号強度から相対的な濃度が定量できる(図2)。

ヒト前腕の浅指屈筋群を対象に表面コイルを前腕内側に密着させて³¹P-NMR スペクトルを測定した。磁石の磁場強度は2.1テスラ(T)、プロトンの共鳴周波数で表現すると90MHzである。ヒト前腕の骨格筋を収縮させ、収縮に対する負荷を漸増させた(図3)。負荷漸増とともにクレアチンリン酸が減少し、筋収縮の終了後に回復した。その間ATPの濃度はほぼ一定である。従って、筋収縮によって消費されたATPはクレアチンキナーゼ反応によってただちに補給され、そのためにクレアチンリン酸の減少したことが理解できる。また無機リン酸の化学シフトの右への変化は細胞内pHの酸性化を示している。

クレアチンキナーゼ反応のフラックス測定

筋収縮の際にATPが消費されると直ちにクレアチンキナーゼ反応によってクレアチンリン酸が分解されてATPが補われた。クレアチンキナーゼは、クレアチンリン酸からADPにリン酸基を転移し、消費されたATPを補給する反応を触媒する。

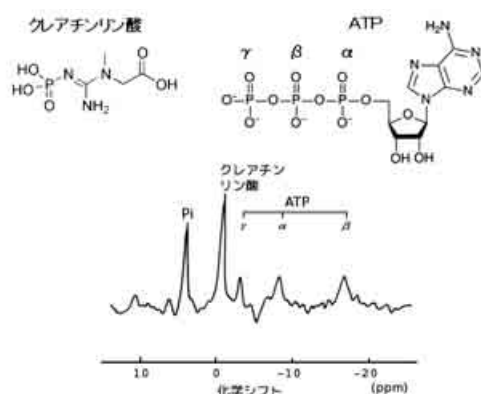


図2 骨格筋の³¹P-NMR スペクトル

単一90°パルスによる腓腹筋(ウシガエルより単離)のスペクトルとリン化合物の化学構造式を示す。Pi: 無機リン酸。(文献4より改変)。

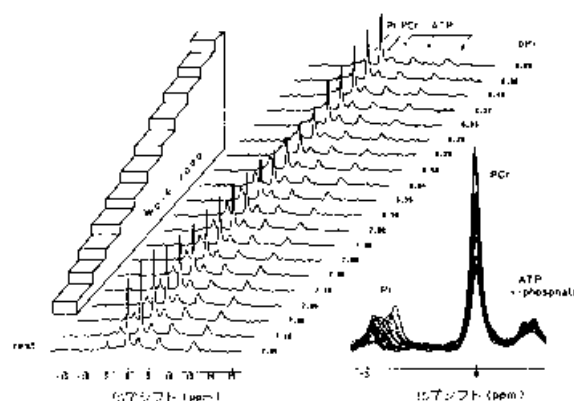


図3 筋運動に伴うヒト骨格筋の³¹P-NMR スペクトル変化

各スペクトルは2秒ごとに32回積算、左手前から右奥に1.2分ごとに安静時(rest, 左下の3ヶ)、筋運動負荷漸増時(work load, 11ヶ)、回復期(右上の6ヶ)で、各々の無機リン酸(Pi)の化学シフト値から計算した筋細胞内pH(pHi)も示す。筋運動は1秒に1回収縮、負荷1kgを各スペクトルごとに増加した。右側に重ねがきしたスペクトルの一部を示す。PCr: クレアチンリン酸。(文献5より改変)。

このクレアチンキナーゼ反応のフラックスが磁気飽和と磁化移動という現象を活用して測定できる。その方法を紹介する⁶⁾。

今、ある原子核に特定の周波数の電波を持続的あるいは短い間隔で繰り返し照射すると、その原子核は磁気飽和という状態となり信号を出さなくなる。ATPの3つのリン酸基のうち最も遠位にある γ 位のリン原子の共鳴周波数の電波を照射すると、そのリン原子は選択的に磁気飽和され、 γ 位の共鳴線はスペクトルに検出できなくなる。このときクレアチンリン酸の共鳴線の強度も少し小さくなった。これは磁気飽和されたATPの γ 位のリン原子がクレアチンキナーゼ反応によってクレアチンリン酸に磁化移動したためである(図4)。このクレアチンリン酸の共鳴線の強度の減少と、クレアチンリン酸に移動したリン原子の磁気飽和からの回復の速さ(時定数: スピン格子緩和時間 T_1)を測定すると、クレアチンリン酸からATPへの反応の速度係数が求められる。

ATPの γ 位のリン原子の磁化を M_{ATP} 、クレアチンリン酸の磁化を M_{PCr} とする。ATPとクレアチンリン酸はクレアチンキナーゼ反応を介してそのリン原子を交換している。今、ATPの γ 位のリン原子を選択的に照射するとそのリン原子は磁気飽和する。これを M_{ATP}^* で示す(図5)。この磁気飽和したATPの γ 位のリン原子はクレアチンキナーゼ反応でクレアチンリン酸のリン原子

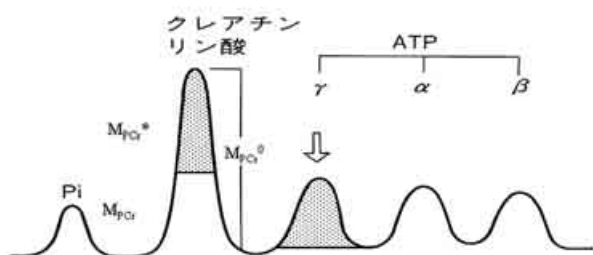


図4 磁気飽和ならびに磁化移動時の ^{31}P -NMR スペクトル変化の概念図

ATP の γ 位のリン原子の共鳴線を選択的に電磁波照射（白抜き矢印）すると、 γ 位のリン原子は磁気飽和され信号を出さなくなり共鳴線は消失する（網掛けの部分）。磁気飽和された γ 位のリン原子がクレアチンキナーゼ反応によってクレアチンリン酸に移動すると（網掛けの部分）、クレアチンリン酸の共鳴線は小さくなる。（文献6より改変）。

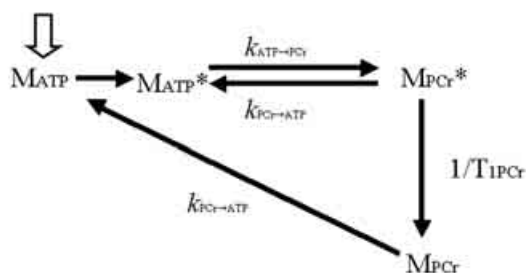


図5 クレアチンキナーゼ反応における磁化の挙動の動力学的モデル（磁気飽和と磁化移動）。（本文参照，文献6より改変）。

に移る。クレアチンリン酸に移動したリン原子はスピン格子緩和時間 $T_{1\text{PCr}}$ の時定数で磁気飽和から回復し、NMR で観測できるクレアチンリン酸のリン原子となる。磁気飽和から回復したクレアチンリン酸のリン原子がクレアチンキナーゼ反応で再び ATP の γ 位のリン原子となると直ちに磁気飽和されて検出できなくなる。

定常状態におけるクレアチンリン酸の信号強度 M_{PCr} に注目すると、クレアチンリン酸の磁気飽和からの回復する速度と、クレアチンキナーゼ反応によって ATP に磁化移動する速度とが等しいはずである。従って、クレアチンリン酸の信号強度の時間微分は、定常状態ではゼロである。

$$dM_{\text{PCr}}/dt = 1/T_{1\text{PCr}} \cdot M_{\text{PCr}}^* - k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}} \cdot M_{\text{PCr}} = 0$$

ここで M_{PCr}^* は磁気飽和されたクレアチンリン酸の磁化であり、 $k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}}$ はクレアチンリン酸から ATP になる速度係数であり、クレアチンキナーゼ反応のクレアチンリン酸分解方向のみかけの速度係数である。

$$M_{\text{PCr}}^* + M_{\text{PCr}} = M_{\text{PCr}}^0$$

とおくと、 M_{PCr}^0 は ATP の γ 位のリン原子の共鳴周波数の電波を照射していないときのクレアチンリン酸の共鳴線の強度である。式を変形すると、

$$k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}} = 1/T_{1\text{PCr}} \cdot (1 - M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0) / (M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0)$$

となる。

つぎにクレアチンリン酸のリン原子の磁化の回復の時定数であるスピン格子緩和時間 $T_{1\text{PCr}}$ を求める必要がある。ATP の γ 位のリン原子の磁気飽和の条件下で測定されるクレアチンリン酸の磁化の回復の時定数、スピン格子緩和時間 $T_{1\text{m}}$ は

$$1/T_{1\text{m}} = 1/T_{1\text{PCr}} + k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}}$$

と表現される。すなわち、クレアチンリン酸から ATP になる速度係数も加わる。この式から前の式を変形すると

$$k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}} = 1/T_{1\text{m}} \cdot (1 - M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0)$$

となる。クレアチンリン酸の信号強度の比 $M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0$ は測定でき、クレアチンリン酸のスピン格子緩和時間 $T_{1\text{m}}$ も測定可能であるから、クレアチンキナーゼ反応の速度係数 $k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}}$ が決定でき、この速度係数にクレアチンリン酸の濃度をかけるとフラックスが求められる。

実際にこの方法をカエル灌流心臓に応用し、クレアチンキナーゼ反応のフラックスを測定した。使用した NMR コイルは心臓の大きさに合わせ、プラスチック製注射器の外筒の外側に銅線を巻き、鞍型コイルを自作した（図6）。測定した灌流心臓の ^{31}P -NMR スペクトルを図7に示す。上段にコントロール(a)，中段に ATP の γ 位リン原子の共鳴周波数の電波を照射し、そのリン原子を選択

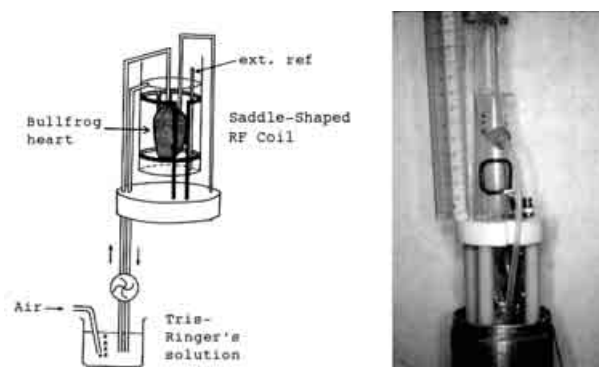


図6 灌流心臓測定用 NMR コイル

灌流心臓（ウシガエル）にあわせてディスポーザブル注射器の外筒に直径 2 mm の銅線を巻き、鞍型コイルを作成した。外部基準（ext. ref.）に 0.1M methylene diphosphonic acid (MDP) を密封したガラス毛細管（径 2 mm）を用いた。（文献7より改変）。

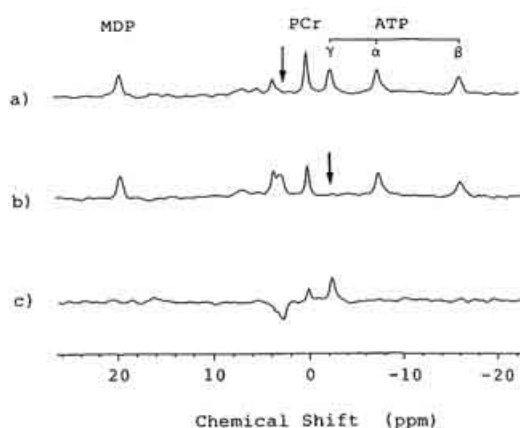


図7 灌流心臓（ウシガエル）の³¹P-NMR 磁気飽和・磁化移動スペクトル

a) コントロール, b) ATP の γ 位のリン酸の共鳴線を選択的に照射, c) 差スペクトル (a-b)。矢印は電磁波の照射位置を示す。30sec ごとに128回積算 (90° パルス), MDP: methylene diphosphonic acid (外部基準), PCr: クレアチンリン酸。(文献7より)。

的に磁気飽和させて測定したスペクトル(b)を示す。ATP の γ 位リン原子の共鳴線は検出できなくなり、同時にクレアチンリン酸の共鳴線の強度が少し小さくなった。なお、上段のコントロール(a)では照射周波数はクレアチンリン酸の共鳴線を中心にその対照となる位置の周波数とした。最下段が差スペクトル(c)で、磁気飽和されたATP の γ 位のリン原子の磁化がクレアチンリン酸に磁化移動したことを示す。クレアチンリン酸の磁化のスピン格子緩和時間 T_{1m} の測定結果を図8に示す。ATP の γ 位のリン原子の磁気飽和の条件下でスペクトル測定の繰り返し時間を段階的に増加させ、信号強度の回復の時定数、スピン格子緩和時間 T_{1m} を求めた。

以上の測定結果を表2に示す。心臓のクレアチンリン酸ならびにATPの濃度は 4.5 および $2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重量であった。クレアチンリン酸の信号強度の比 $M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0$ は 0.60 倍となり、測定されたクレアチンリン酸の T_{1m} は 1.9 秒であった。これらから計算されたクレアチンリン酸のスピン格子緩和時間 $T_{1\text{PCr}}$ は 3.1 秒で、みかけの速度係数 0.22sec^{-1} にクレアチンリン酸の濃度を乗算して $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{湿重量} \cdot \text{sec}^{-1}$ となった。

同じ灌流条件で測定した心臓の酸素消費量 $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{湿重量} \cdot \text{min}^{-1}$ から、酸素原子1ヶあたりATPが3ヶできると仮定してATPの正味の回転速度を求めると、 $0.014 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{湿重量} \cdot \text{sec}^{-1}$ となった。クレアチンキナーゼ反応のフラックスはこのATPの消費速度の70倍以上あり、心筋細胞内においてクレアチンキナーゼ反応

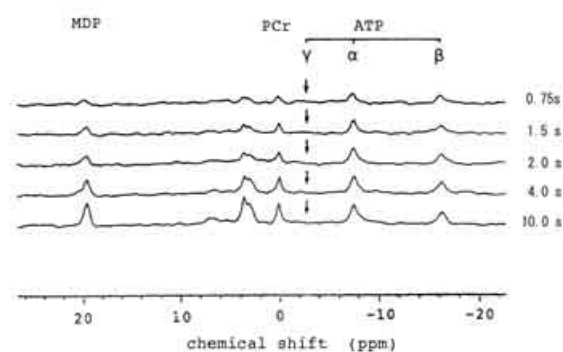


図8 灌流心臓におけるクレアチンリン酸の T_{1m} 緩和時間測定

上: ATP の γ 位のリンの共鳴線を選択的に照射 (矢印), 磁気飽和した条件下で、逐次飽和法による積算の繰り返し時間0.75, 1.5, 2, 4, 10秒で測定した灌流心臓 (ウシガエル) の³¹P-NMR スペクトル。

下: 横軸に繰り返し時間, 縦軸にクレアチンリン酸の共鳴線の高さをとり、単一指数関数へのフィッティングにて T_{1m} を求めた。(文献7より)。

表2 ウシガエル灌流心臓の³¹P-NMR 磁気飽和及び磁化移動実験

クレアチンリン酸濃度	4.5 ± 0.6	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{wet wt}$
ATP 濃度	2.3 ± 0.3	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{wet wt}$
$M_{\text{PCr}}/M_{\text{PCr}}^0$	0.60 ± 0.02	
T_{1m}	1.9 ± 0.3	sec
$T_{1\text{PCr}}$	3.1 ± 0.6	sec
$k_{\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}}$	0.22 ± 0.04	sec^{-1}
クレアチンキナーゼ反応の flux	1.0 ± 0.3	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{wet wt} \cdot \text{sec}^{-1}$
酸素消費	0.14 ± 0.03	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{wet wt} \cdot \text{min}^{-1}$
ATP の正味の回転速度*	0.014 ± 0.003	$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{wet wt} \cdot \text{sec}^{-1}$

$n=4$ (平均値±標準偏差), * $P/O=3$ として計算。(文献7より改変)。

は平衡状態にあると考えられる (図9)。

人体での知見

³¹P-NMR スペクトロスコピーをヒト心臓に用い、磁気飽和と磁化移動現象を活用して心筋と胸壁骨格筋のク

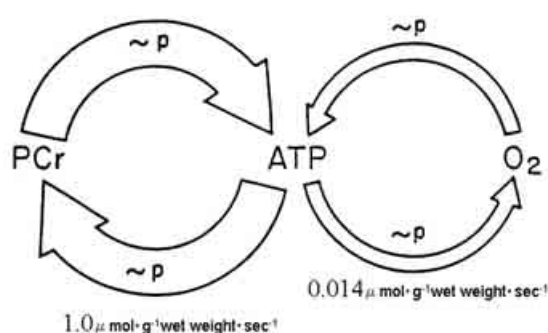


図9 心臓（ウシガエル）におけるクレアチンキナーゼ反応のフラックスと酸素消費から推定されるATPの正味の回転率の比較。（文献7より作図）。

クレアチンリン酸、ATPの濃度、クレアチンキナーゼ反応のフラックス測定を米国ジョン・ホプキンス大学のBottomleyらのグループが2005年、GE社製の1.5Tの磁石を使って報告している⁸⁾。

健常者に強心剤としてβ刺激剤のドブタミンを投与し、酸素消費に比例するといわれるダブルプロダクト、血圧と心拍数の積を2倍にした状態と安静時とを比較し、さらに心不全患者にも安静状態で測定している。

健常者ではこの生理的な負荷の増加によってもクレアチンキナーゼ反応のフラックスは有意に増加しなかった。心不全の患者ではATPの濃度は健常者と変わらなかったが、クレアチンリン酸の濃度ならびにクレアチンキナーゼ反応のフラックスの有意な低下を見出している（表3）。

以上のように、実験動物に限らず、ヒトにも³¹P-NMRスペクトロスコピーを用いて、細胞内の代謝物の濃度や酵素反応速度が非破壊的に経時的に観察でき、分子機能情報が医学・生理学に活用できる時代が来ている。また、

トランスジェニックマウスへの応用⁹⁾やヒト骨格筋におけるP/O比の測定¹⁰⁾、筋血流と酸素供給のNMRイメージングとスペクトルの総説¹¹⁾なども報告されているので参照されたい。

文 献

- 1) Hashemi, R. H., Bradley, W. G.: MRI: the basics, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1997; 荒木 力 (訳): MRIの基礎, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 1998
- 2) Gadian, D. G.: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems, Oxford University Press, New York, 1982; 今井昭一 (訳): NMR生体系への応用, 西村書店, 新潟, 1985
- 3) 荒木 力: クイズMRI, 秀潤社, 東京, 2000
- 4) 吉崎和男, 早野尚志: 筋肉の実験MRS. 磁気共鳴スペクトルの実際 (成瀬昭二 編), 医学書院, 東京, 1995, pp. 190-200
- 5) 吉崎和男, 早野尚志, 平川和文: エネルギー産生の分子機構. 分子の目でみた骨格筋の疲労 (吉岡利忠 監, 山田 茂, 後藤勝正 編), ナップ, 東京, 2003, pp. 252-274
- 6) 吉崎和男, 西川弘恭: *in vivo* NMRスペクト, 高分解能NMR—基礎と新しい展開— (斉藤 肇, 森島 績 編), 東京化学同人, 東京, 1987, pp. 213-227
- 7) 早野尚志: ³¹P-NMRによる灌流心クレアチン・キナーゼ反応の解析. 京府医大誌, 103: 289-299, 1994
- 8) Weiss, R. G., Gerstenblith, G., Bottomley, P. A.: ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 808-813, 2005

表3 正常対照者および心不全患者のクレアチンリン酸、ATPの代謝レベル

	クレアチンリン酸 μmol · g ⁻¹ wet wt	ATP μmol · g ⁻¹ wet wt	k _{PCr→ATP} sec ⁻¹	クレアチンキナーゼ反応の flux μmol · g ⁻¹ wet wt · sec ⁻¹	n
胸壁の骨格筋					
健常者	27±8	8.2±2.4	0.22±0.07	5.7±2.2	14
心不全患者	26±8	8.4±3.4	0.21±0.08	5.1±2.2	13
心筋					
健常者					
安静時	10.1±1.2	5.7±1.3	0.32±0.07	3.2±0.9	16
ドブタミン負荷時	9.9±1.2	5.6±1.4	0.33±0.09	3.3±1.2	6
心不全患者	8.3±2.6*	5.2±1.3	0.21±0.07**	1.6±0.6**	17

平均値±標準偏差。*, p=0.03 vs. 健常者; **, p<0.0005 vs. 健常者。（文献8より改変）。

- 9) Pinz, I., Ostroy, S. E., Hoyer, K., Osinska, H., *et al.* : Calcineurin-induced energy wasting in a transgenic mouse model of heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294** : H1459-1466, 2008
- 10) Cettolo, V., Cautero, M., Tam, E., Francescato, M. P. : Mitochondrial coupling in humans: assessment of the P/O₂ ratio at the onset of calf exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **99** : 593-604, 2007
- 11) Carlier, P. G., Bertoldi, D., Baligand, C., Wary, C., *et al.* : Muscle blood flow and oxygenation measured by NMR imaging and spectroscopy. *NMR Biomed.*, **19** : 954-967, 2006

³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy on molecular kinetics

Takashi Hayano^{*,**}, and Kazuo Yoshizaki^{*}

^{*}Department of Physiology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan ; and ^{**}Otsu Municipal Hospital, Shiga, Japan

SUMMARY

Nuclear magnetic resonance (NMR) phenomenon discovered by Bloch and Purcell in 1945 is now used in a clinical diagnostic tool as MRI through the imaging technique suggested in 1973 by Lauterbur. Here, we explain ³¹P-NMR spectroscopy and the method of observing an enzyme reaction velocity *in vivo*.

When phosphorus compounds are placed in a magnetic field, the phosphorus nucleus absorbs and discharges the energy of radio wave at a specific frequency in proportion to the magnetic field intensity. The effective magnetic field on nucleus is reduced by the surrounding electrons, and the shielding effect of the electrons on nucleus causes to reduce the resonance frequency of the nucleus. The shielding effect is expressed as a chemical shift. We can identify molecular structures based on the chemical shifts of resonance lines, and this technique is called an NMR spectroscopy. The phosphorus compounds such as ATP, phosphocreatine and inorganic phosphate can be detected simultaneously and quantified, based on ³¹P-NMR spectroscopy of living muscle.

We can also measure the reaction velocity of creatine kinase, by using the phenomena of saturation and magnetization transfer on ³¹P-NMR spectroscopy. The nucleus can be placed in a condition of magnetic saturation by the repeated irradiation of the radio wave at the resonance frequency. When the γ phosphate group of ATP is selectively saturated on living muscle, the resonance line of phosphocreatine becomes small, indicating the magnetization transfer from saturated phosphorus atom of γ phosphate group of ATP to phosphorus atom of phosphocreatine. The phosphate exchange reaction is catalyzed by creatine kinase. The flux of the reaction from phosphocreatine to ATP can be calculated with the measurement of the recovery rate from saturation (spin-lattice relaxation time, T₁) of phosphocreatine. The applications on perfused heart isolated from bullfrog and also on human heart and chest skeletal muscle *in situ* were reported. The decreases in both phosphocreatine concentration and the flux of creatine kinase reaction were found in the patients of congestive heart failure.

Key words : ³¹P-NMR, magnetization transfer, creatine kinase, heart